



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.010
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(4):524-528.

· 基础研究 ·

上调 miRNA-34a 表达对人结肠癌细胞体外生长的影响

李军, 许荣华, 周晓华, 黄亮

(海南医学院附属医院 普通外科, 海南海口 570102)

摘要

目的: 探讨上调 miRNA-34a 表达对人结肠癌细胞株体外生长的影响。

方法: 分别用人工合成的 miRNA-34a 模拟物与阴性对照序列转染人结肠癌 HT-29 细胞, 培养一定时间后, 用 MTT 法检测细胞增殖情况; 流式细胞技术检测细胞的凋亡; qRT-PCR、Western blot 法检测 SIRT1 的 mRNA 和蛋白的表达。

结果: 与转染阴性序列的 HT-29 细胞比较, 转染 miRNA-34a 模拟物的 HT-29 细胞 48 h 后增殖能力明显降低; 72 h 后细胞凋亡率明显增加, miRNA-34a 靶基因 SIRT1 的 mRNA 与蛋白表达均明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: miRNA-34a 可能通过调节其靶基因 SIRT1 的表达影响结肠癌细胞的生物学行为, 上调 miRNA-34a 的表达能抑制结肠癌细胞的生长。

关键词

结肠肿瘤; 微 RNAs; 细胞增殖
中图分类号: R735.3

Effect of miRNA-34a up-regulation on growth of human colon cancer cells in vitro

LI Jun, XU Ronghua, ZHOU Xiaohua, HAUNG Liang

(Department of General Surgery, the Affiliated Hospital, Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

Abstract

Objective: To investigate the effect of up-regulating miRNA-34a expression on growth of human colon cancer cells in vitro.

Methods: Human colon cancer HT-29 cells were transfected with artificially synthesized miRNA-34a mimics and negative control sequences respectively. After culture for various times, the cell proliferation was measured by MTT assay, the apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression of SIRT1 mRNA and protein was detected by qRT-PCR and Western blot analysis, respectively.

Results: Compared with HT-29 cells transfected with negative control sequences, the proliferation of HT-29 cells transfected with miRNA-34a mimics was significantly decreased after 48-h culture; the apoptosis rate was significantly increased, and both expressions of SIRT1 mRNA and protein were significantly down-regulated after 72-h culture, and all differences had statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: MiRNA-34a can influence the biological behaviors of colon cancer cells probably through regulating

基金项目: 海南省自然科学基金资助项目 (20158351)。

收稿日期: 2015-11-26; 修订日期: 2016-03-06。

作者简介: 李军, 海南医学院附属医院副主任医师, 主要从事结直肠癌的临床与基础方面的研究。

通信作者: 李军, Email: ljpxn8183@163.com

expression of its target gene SIRT1, and up-regulating miRNA-34a expression can inhibit the growth of colon cancer cells.

Key words Colonic Neoplasms; MicroRNAs; Cell Proliferation

CLC number: R735.3

结肠癌 (colon cancer) 是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 其发病率及病死率已居所有恶性肿瘤的第2位^[1]。文献^[2]报道, 我国结肠癌的发病率位居所有恶性肿瘤的第3位, 且呈现逐年上升的趋势, 但结肠癌的发生、发展的分子机制仍不清楚。微小RNA (microRNA, miRNA) 是一种大小为19~25 bp的单链小分子RNA, 其通过与其靶mRNA的3'-UTR区结合, 下调靶基因的表达水平, 阻止mRNA的翻译。研究^[3]表明, 多种miRNA在结肠癌中存在差异表达, 并能调控结肠癌细胞的增殖、凋亡、转移等多种生物学行为。miR-34a是一种位于染色体1p36, 可单独转录表达的基因, 在多种肿瘤中表达均下调, 其表达水平的下调参与调控肿瘤细胞的生长、迁移以及化疗抵抗等肿瘤细胞的生物学特性^[4-6]。然而, miR-34a在结肠癌细胞中的生物学功能及其分子机制尚未见相关报道。本研究通过人工合成的miR-34a模拟物转染至人结肠癌细胞株HT-29, 探讨miR-34a及其靶基因SIRT1在结肠癌中的发生、发展机制, 为研究结肠癌的发生机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人结肠癌细胞株HT-29购自中科院上海细胞生物研究所; 胎牛血清 (FBS) 和DMEM细胞培养液购自Gibco公司; 总RNA提取试剂盒TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; real time PCR试剂盒购自TaKaRa公司; 逆转录试剂盒M-MLV购自美国Promega公司; SYBR premix ex taq试剂盒购自美国Axygen公司; 目的基因及内参引物均有上海生物工程公司设计和合成; miRNA-34a模拟物及对照序列购自广州锐博生物科技有限公司; 兔抗人SIRT1单克隆抗体购自CST公司; 细胞凋亡试剂盒购自美国eBioscience公司。

1.2 细胞培养

人结肠癌细胞株HT-29培养在含10%FBS的DMEM细胞培养液中, 置于37 °C 5% CO₂培养箱培养, 待细胞生长90%汇合后进行传代, 传代2~3代后取对数生长期细胞进行后续实验。

1.3 人结肠癌细胞株 HT-29 转染

HT-29细胞接种于6孔板中, 采用含10%FBS的DMEM细胞培养液培养细胞至汇合达50%时, 实验组每孔加入100 pmol/L miRNA-34a模拟物及5 μL Lipofectamine™ 2000; 对照组每孔加入100 pmol/L对照序列及5 μL Lipofectamine™ 2000。每孔加入不含FBS的DMEM细胞培养液2 mL, 置于37 °C 5% CO₂培养箱培养6 h后, 更换细胞培养液继续培养。

1.4 细胞活力测定

收集转染24、48、72 h后的HT-29细胞, 无血清的DMEM培养液重悬细胞后制备细胞数为 1×10^5 /mL的单细胞悬液。以每孔200 μL接种于96孔板, 每组设6个复孔及1个空白对照孔, 置于37 °C 5% CO₂培养箱培过夜。加入20 μL终浓度为5 mg/mL的MMT溶液, 避光培养4 h, 弃去上清后每孔加入DMSO溶液150 μL, 37 °C低速振荡孵育10 min。置于酶标仪上测定各孔490 nm的吸光度值。以0 h实验组及对照组的吸光度值为1, 计算不同时间段两组吸光度 (OD) 值表示相对细胞增殖率, 每个样本重复实验3次。

1.5 细胞凋亡检测

收集转染72 h后的HT-29细胞, 0.01 mol/L的预冷PBS溶液细胞细胞2次, 胰酶消化细胞, 0.01 mol/L的PBS溶液再次洗涤细胞, 1 500 r/min离心5 min后弃上清, 1 × 结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞数为 1×10^6 /mL, 每管加入500 μL细胞悬液、5 μL annexin V-FITC和10 μL PI充分混匀后, 室温下避光反应10 min, 进行流式细胞术检测细胞凋亡。

1.6 qRT-PCR 检测 SIRT1 mRNA 的表达

收集转染72 h后的HT-29细胞, 按 TRIzol试

剂盒说明书提取细胞总RNA,按逆转录试剂盒说明书设置反转录条件:70℃预变性5 min,37℃逆转录反应1 h,85℃反应5 min。每个样本均设置3个复孔,取2 μL cDNA配制RT-PCR体系,按下面条件进行PCR反应:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火延伸30 s,扩增40个循环。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算SIRT1 mRNA的相对表达量。以β-actin作为内参。

1.7 Western blot 检测 SIRT1 蛋白的表达

收集转染72 h后的HT-29细胞,加入RIPA细胞裂解液置冰上裂解10 min。收集裂解的细胞置1.5 mL EP管中,4℃14 000 r/min离心10 min,取上清。BCA法测定总蛋白浓度,每孔加入50 μg蛋白样品,100 g/L SDS-PAGE分离蛋白。采用Bio-Rad半干转印系统,20 V转膜1 h,50 g/L BSA室温封闭1.5 h,加入兔抗人SIRT1单克隆抗体(1:1 000)及小鼠抗人β-actin抗体(1:1 000),4℃孵育过夜,0.01 mol/L TBST漂洗5 min×3次,分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG,37℃孵育1 h,0.01 mol/L TBST漂洗5 min×3次。暗室内,在膜上滴加ECL溶液,并使胶片曝光,全

自动洗片机洗片。

1.8 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件进行分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-34a 模拟物转染的转染效率

采用脂质体转染法转染miRNA-34a模拟物人结肠癌细胞HT-29后,用RT-PCR检测miRNA-34a模拟物的转染效率,结果显示,实验组miRNA-34a的表达水平明显高于阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$) (图1)。

2.2 miRNA-34a 过表达对人结肠癌细胞 HT-29 增殖能力的影响

采用MTT法检测转染miRNA-34a模拟物24、48、72 h后人结肠癌细胞HT-29增殖情况的变化。结果表明,实验组转染miRNA-34a模拟物48 h后人结肠癌细胞HT-29增殖能力明显低于阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$) (图2)。

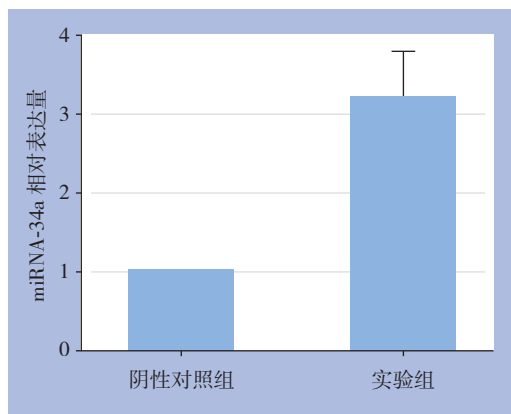


图1 RT-PCR 检测 miRNA-34a 模拟物转染效率

Figure 1 RT-PCR detection for transfection efficiency of miRNA-34a

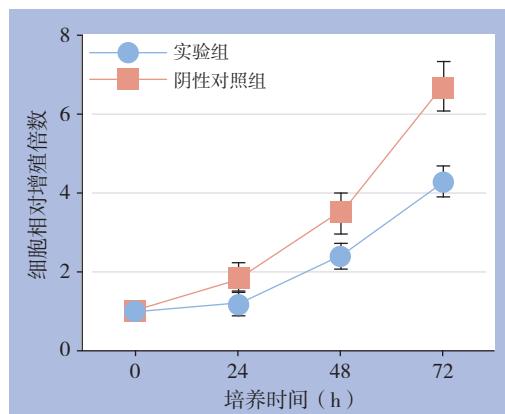


图2 miRNA-34a 对 HT-29 细胞增殖能力的影响

Figure 2 Effect of miRNA-34a on cell proliferation in HT-29 cells

2.3 miRNA-34a 过表达对人结肠癌细胞 HT-29 凋亡的影响

采用流式细胞技术检测miRNA-34a模拟物转染人结肠癌HT-29细胞72 h后细胞凋亡情况,结果显示,实验组细胞凋亡率明显高于阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$) (图3)。

2.4 miRNA-34a 下调 HT-29 细胞 SIRT1 的表达水平

采用qRT-PCR和Western blot法检测miRNA-34a过表达后HT-29细胞SIRT1 mRNA和蛋白的表达水平,结果显示,实验组SIRT1 mRNA和蛋白的表达水平均明显低于阴性对照组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$) (图4)。

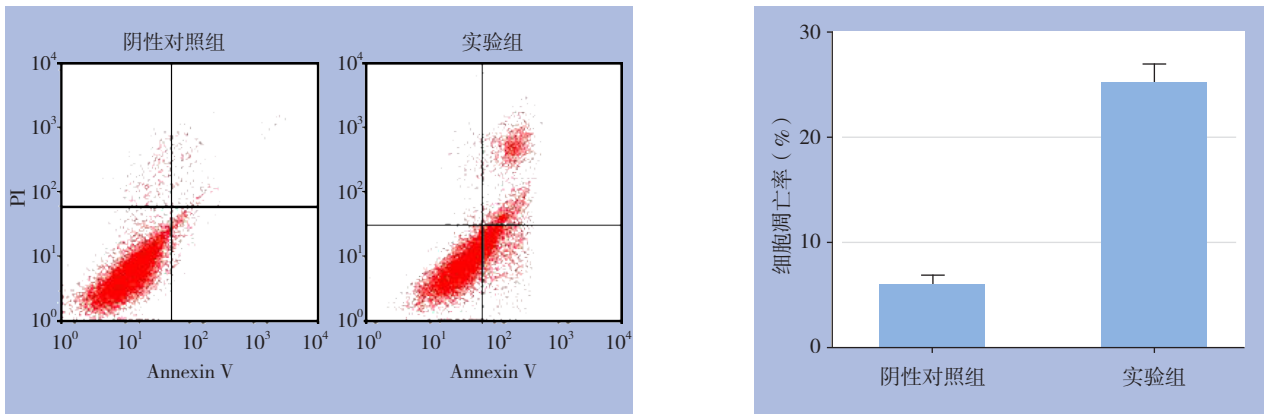


图3 miRNA-34a 对 HT-29 细胞凋亡的影响
Figure 3 Effect of miRNA-34a on apoptosis in HT-29 cells

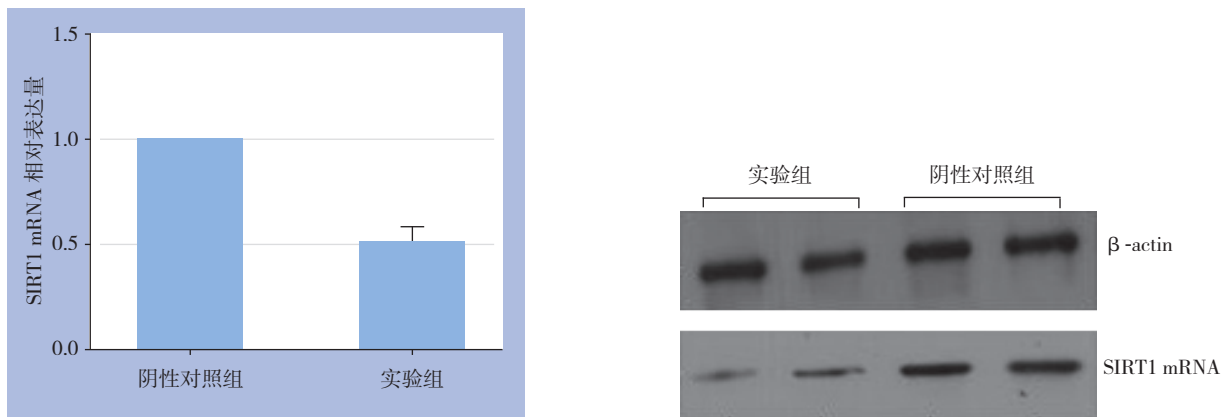


图4 miRNA-34a 对 HT-29 细胞 SIRT1 mRNA 和蛋白表达的影响 A: SIRT1 mRNA 表达; B: SIRT1 蛋白表达
Figure 4 Effect of miRNA-34a on the expression of SIRT1 mRNA and protein in HT-29 cells A: SIRT1 mRNA expression; B: SIRT1 protein expression

3 讨论

结肠癌是最为常见的恶性肿瘤之一，其发病机制仍不明确，目前治疗最有效的方法是根治性手术联合化疗，患者术后5年生存率大约为93%^[7]。然而近50%的结肠癌患者在初次就诊时便已失去根治性手术机会，甚至超过30%患者手术之后出现复发^[8]。因此，寻找新的有效的结肠癌生物治疗靶点，已成为提高结肠癌诊治的重要途径。

miRNA是一类内源性的非编码的小RNA，通过与靶基因mRNA的3'非翻译区结合，形成发卡样结构，从而下调靶基因的表达，抑制靶蛋白的翻译^[9]。MiR-34a是一种肿瘤抑制因子，调控多种肿瘤的发生、发展。目前研究^[10]表明miRNA-34a可靶向结合多种蛋白的mRNA，从而调控相关功能。研究^[11-13]显示，miRNA-34a在胰腺癌细胞、前列腺癌细胞和胃癌细胞中具有抑制肿瘤细

胞增殖、促进细胞凋亡的作用。Rathod等^[14]研究发现，神经瘤细胞过表达miRNA-34a可显著抑制细胞的增殖、促进细胞的凋亡。本研究通过瞬时转染方法，在结肠癌HT-29细胞中过表达miRNA-34a，MTT和流式细胞技术检测miRNA-34a可显著抑制HT-29细胞的增殖且促进细胞凋亡。结果提示miRNA-34a过表达可能与结肠癌细胞的自我更新存在关系。

SIRT1是一种NAD⁺依赖的去乙酰化酶，参与多种生理过程的调节，不同种类的肿瘤发挥抑癌基因和癌基因的双重调节作用^[15-16]。SIRT1与细胞生存密切相关，可参与调控p53、bcl-2等多种细胞凋亡蛋白，从而调节细胞的凋亡^[17]。Zhou等^[18]研究表明，SIRT1在前列腺癌的表达明显下调，发挥抑癌基因的作用。荧光素酶报告实验验证在胃癌细胞中SIRT1为miRNA-34a的下游靶蛋白^[19]。此外，miRNA-34a可靶向抑制SIRT1的表达，增

加胰腺癌细胞的化疗敏感性, 并抑制胰腺癌细胞的增殖^[20]。本研究通过使用化学合成的miRNA-34a模拟物 and 对照序列转染至结肠癌细胞株来调节miRNA-34a在HT-29细胞中的表达水平, 且采用qRT-PCR技术对miRNA-34a的表达进行验证。采用qRT-PCR和Western blot技术验证miRNA-34a的异常表达对结肠癌HT-29细胞SIRT1 mRNA和蛋白表达水平的影响。结果显示, miRNA-34a过表达可显著抑制结肠癌HT-29细胞SIRT1 mRNA和蛋白表达水平。提示在结肠癌细胞中, miRNA-34a可通过调控SIRT1的表达水平来调节细胞的增殖和凋亡。

综上所述, miRNA-34a可能通过下调SIRT1的表达水平发挥抑制结肠癌细胞增殖并促进癌细胞凋亡作用。因此, miRNA-34a可能成为新的结肠癌生物治疗靶点。

参考文献

- [1] Hold GL. Gastrointestinal microbiota and colon cancer [J]. *Dig Dis*, 2016, 34(3):244-250.
- [2] 康清杰, 向征. 结肠癌筛查和诊疗的研究进展[J]. *重庆医学*, 2015, 44(28):4001-4003.
Kang QJ, Xiang Z. Progress in screening, diagnosis and treatment of colon cancer [J]. *Chongqing Medical Journal*, 2015, 44(28):4001-4003.
- [3] 邢荣春, 郑军, 刘伟, 等. 微小RNA在结直肠癌临床诊断中的作用及其研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(10):1275-1278.
Xing RC, Zheng J, Liu W, et al. MicroRNAs in clinical diagnosis of colorectal cancer and recent advances[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2012, 21(10):1275-1278.
- [4] Saito Y, Nakaoka T, Saito H. microRNA-34a as a therapeutic agent against human cancer[J]. *J Clin Med*, 2015, 4(11):1951-1959.
- [5] Shi H, Zhou S, Liu J, et al. miR-34a inhibits the in vitro cell proliferation and migration in human esophageal cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2016, pii: S0344-0338(16)30029-2. doi: 10.1016/j.prp.2016.02.019. [Epub ahead of print].
- [6] Kang L, Mao J, Tao Y, et al. MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(6):700-708.
- [7] National Cancer Intelligence Network (NCIN): Data Briefing. Colorectal Cancer Survival by Stage. http://www.ncin.org.uk/publications/data_briefings/colorectal_cancer_survival_by_stage.aspx.
- [8] Tobohov A, Nikolaev V. Results of colon cancer surgical treatment[J]. *Wiad Lek*, 2015, 68(4):512.
- [9] 赵本和. 直肠癌中差异表达的microRNA及其与预后因子的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(10): 1437-1439.
- Zhao BH. Different expressions of microRNA in rectal cancer and the relationship to prognostic factors[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(10):1437-1439.
- [10] Ma ZB, Kong XL, Cui G, et al. Expression and clinical significance of miRNA-34a in colorectal cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(21):9265-9270.
- [11] Lin L, Jiang H, Huang M, et al. Depletion of histone deacetylase 1 inhibits metastatic abilities of gastric cancer cells by regulating the miR-34a/CD44 pathway[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2):663-672.
- [12] Gaur S, Wen Y, Song JH, et al. Chitosan nanoparticle-mediated delivery of miRNA-34a decreases prostate tumor growth in the bone and its expression induces non-canonical autophagy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30):29161-29177.
- [13] Li Y, Guessous F, Zhang Y, et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19):7569-7576.
- [14] Rathod SS, Rani SB, Khan M, et al. Tumor suppressive miRNA-34a suppress cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signalling pathways[J]. *FEBS Open Bio*, 2014, 4:485-495. doi: 10.1016/j.fob.2014.05.002.
- [15] Asaka R, Miyamoto T, Yamada Y, et al. Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target[J]. *Lab Invest*, 2015, 95(12):1363-1373.
- [16] Li C, Wang L, Zheng L, et al. SIRT1 expression is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma[J]. *Oncotargets Ther*, 2015, 8:977-984. doi: 10.2147/OTT.S82378.
- [17] Kim H, Lee KH, Park IA, et al. Expression of SIRT1 and apoptosis-related proteins is predictive for lymph node metastasis and disease-free survival in luminal A breast cancer[J]. *Virchows Arch*, 2015, 467(5):563-570.
- [18] Zhou ZW, Li XX, He ZX, et al. Induction of apoptosis and autophagy via sirtuin1- and PI3K/Akt/mTOR-mediated pathways by plumbagin in human prostate cancer cells[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9:1511-1554. doi: 10.2147/DDDT.S75976.
- [19] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(36):13421-13426.
- [20] Oon CE, Strell C, Yeong KY, et al. SIRT1 inhibition in pancreatic cancer models: contrasting effects in vitro and in vivo[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 757:59-67. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.064.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 李军, 许荣华, 周晓华, 等. 上调miRNA-34a表达对人结肠癌细胞体外生长的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(4):524-528. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.010
Cite this article as: Li J, Xu RH, Zhou XH, et al. Effect of miRNA-34a up-regulation on growth of human colon cancer cells in vitro[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(4):524-528. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.010